

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-330614

(43) 公開日 平成7年(1995)12月19日

(51) Int.Cl. ^a	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70				
9/107	E			
48/00				
C 1 2 N 15/09		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数12	F D (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平6-142217

(22) 出願日 平成6年(1994)6月2日

(71) 出願人 391043055

株式会社エルティーティー研究所
神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1

(72) 発明者 川合 真一

神奈川県川崎市宮前区菅生2丁目16番1号
聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター内

(72) 発明者 八幡 直和

神奈川県川崎市宮前区菅生2丁目16番1号
聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター内

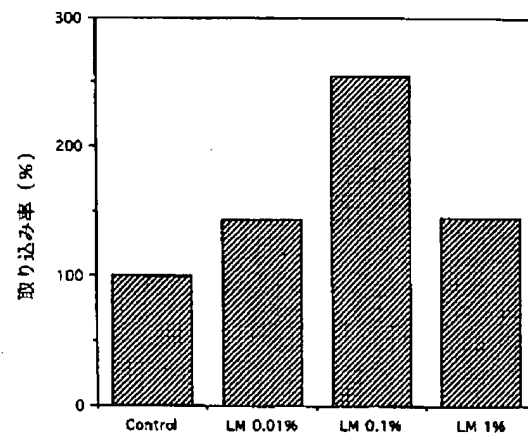
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子の細胞内導入用脂肪乳剤

(57) 【要約】

【目的】 個体に遺伝子DNAを導入する、遺伝子の細胞内導入用脂肪乳剤に係り、脂肪乳剤中のリピッドマイクロソフェアが、導入遺伝子DNAに対しキャリアとして作用し、遺伝子導入ができる脂肪乳剤の提供。

【構成】 少なくとも以下の組成、(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数8~12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6~18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、(d) 必要に応じ、コレステロール誘導体、および、(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも以下の組成、(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数8～12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6～18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、(d) 必要に応じ、コレステロール誘導体、および、(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤。

【請求項2】 請求項1記載の脂肪乳剤であって、少なくとも、(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数8～12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6～18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤：5～50% (W/V)、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤：0.05～25% (W/V)、(d) コレステロール誘導体：0.001～1% (W/V)、および、(e) 水、からなる、請求項1記載の脂肪乳剤。

【請求項3】 請求項1記載の脂肪乳剤であって、少なくとも、(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数8～12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6～18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤：5～50% (W/V)、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤：0.05～25% (W/V)、および、(e) 水、からなる、請求項1記載の脂肪乳剤。

【請求項4】 導入遺伝子DNAが、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、GM-CSF、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、PDGF (血小板由来成長因子)、ジフテリアトキシンA、HVS-tk、シトシンデアミナーゼの遺伝子DNAから選択される1種の遺伝子DNAである、請求項1記載の脂肪乳剤。

【請求項5】 少なくとも以下の組成、(a) インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、GM-CSF、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、PDGF (血小板由来成長因子)、ジフテリアトキシンA、HVS-tk、シトシンデアミナーゼの遺伝子DNAから選択される1種の遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数8～12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6～18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリド

から選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、(d) 必要に応じ、コレステロール誘導体、および、(e) 水、からなる、請求項2または3記載の脂肪乳剤。

【請求項6】 植物油が大豆油である、請求項5記載の脂肪乳剤。

【請求項7】 リン脂質が大豆リン脂質または卵黄リン脂質である請求項5記載の脂肪乳剤。

10 【請求項8】 コレステロール誘導体が、3 β -(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル)コレステロールまたは2-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)エチルアミンである、請求項5記載の脂肪乳剤。

【請求項9】 グリセリン、糖アルコール、単糖類、二糖類およびアミノ酸から選択される少なくとも1種の等張化剤をさらに含有する、請求項5記載の脂肪乳剤。

20 【請求項10】 炭素原子数10～20の脂肪酸およびその塩、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリンおよびステアリルアミンから選択される少なくとも1種の乳化補助剤をさらに含有する、請求項5記載の脂肪乳剤。

【請求項11】 コレステロールおよびトコフェロールから選択される安定化剤をさらに含有する、請求項5記載の脂肪乳剤。

【請求項12】 アルブミンおよびその脂肪酸アミド誘導体ならびに多糖類およびその脂肪酸エステル誘導体から選択される少なくとも1種の安定化剤をさらに含有する、請求項5記載の脂肪乳剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、個体に遺伝子DNAを導入する、遺伝子の細胞内導入用脂肪乳剤に係り、詳細には、遺伝子治療において患者の細胞に外来遺伝子を導入することによって疾患の治療を行なうため、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 遺伝子工学の進歩により、疾患の分子レベルでの病態学的側面や、その原因遺伝子が解明され、体細胞を遺伝子レベルで改変し、難治性疾患の治療に役立たせようとする、いわゆる遺伝子治療の試みが最近注目を浴びてきている。例えば、一部の癌は遺伝子異常により引き起こされ、様々な遺伝子異常を蓄積した遺伝子病と考えられるが、仮にこれらの遺伝子異常を修復することができるとすれば、癌を治癒することができると考えられる。しかしながら、遺伝子工学が進歩したといっても、現在の遺伝子操作は未熟なものであり、正確かつ高率に、遺伝子を特定の細胞あるいはDNA上の特定の部位に挿入することはできない。したがって、このような背景のもとに、欧米、特にアメリカにおいては遺伝子治療

の試みがしだいに多く行なわれてきているものの、あくまで実験的医療としての遺伝子治療であり、その対象には、致命的な進行癌、AIDS、先天性代謝異常などの致命的疾患患者が選ばれ、その遺伝子治療効果の有効性が期待されている現状である。

【0003】しかしながら、遺伝子を正確に、また確実に特定の細胞あるいはDNA上の特定部位に挿入することができれば、遺伝子治療の有効性が確立し、難治病疾患患者に多大の光明を与えるものである。その第一歩は、遺伝子DNAを細胞内に効率よく安全に導入することであるといえる。これまでに確立している遺伝子治療の方法としては、遺伝子導入細胞を患者に移植する方法(ex vivo法)と、細胞を介さずに直接個体に遺伝子自体を注入する方法(in vivo法)の2方法がある。この場合、in vivo法は、標的細胞の採取、分離、保存、培養、移植などの操作を必要としないという点で、施行し易い利点を有しているが、ex vivo法の方が、目的とする細胞への遺伝子導入がより確実にできることより、現時点において広く採用されている。特に、ex vivo法における遺伝子導入に際しては、ウイルス・ベクターを用いる方法が主流を占め、レトロウイルス・ベクター、アデノウイルス・ベクター、アデノ関連ウイルス・ベクター等が挙げられる。これらのなかでも特に、レトロウイルス・ベクターについては、その安全性と導入遺伝子の長い発現期間がほぼ確認されてきたことより、これらレトロウイルス・ベクターの性状を生かして、ex vivo法における導入法として汎用されてきている。

【0004】しかしながら、最近急速に研究が行なわれてきた細胞ターゲティング法が確立すれば、遺伝子治療の主流は、in vivo法に変わっていくものと考えられる。かかる考え方を採用した方法として、遺伝子DNAそのものに細胞親和性を持つ物質を結合させるか、または細胞親和性を持つ物質でくるむか、あるいは結合させた人工の粒子を作り、それを細胞内に導入する方法がある。たとえば、in vitroで遺伝子DNAと適当な脂質、例えばリン脂質とを混合し、超音波処理すると、DNAを含んだ小胞体、すなわちリボソームができる。また、すでに作製したリボソームにDNAを添加し、電荷により結合させることができる。これらのリボソームを細胞へ与えて接触させると、リボソーム膜と細胞膜は融合して、リボソーム内のDNAは細胞へ移行する。さらに一部のDNAは核内へ入って遺伝子の導入が行なわれるのである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記の遺伝子治療におけるリボソームに代わる遺伝子導入技法として、脂肪小粒子(リピッドマイクロスフェア)を用いたDDS(ドラッグデリバリーシステム)に着目した。この方法を用いれば、ex vivoにおいても、

またin vivoにおいても、安全にまた効率よく遺伝子DNAを細胞内に導入し得ることが期待される。すなわち、導入遺伝子DNAを、脂肪乳剤中のリピッドマイクロスフェアに結合してやれば、該リピッドマイクロスフェアがキャリアとなって、選択的に癌(腫瘍)細胞等に移送され、その場でリピッドマイクロスフェアに結合された遺伝子DNAが核内に入って、遺伝子の導入が行なわれ、有効な遺伝子治療法の確立ができ得るものと考えられる。その点について本発明者らは鋭意検討を加えた結果、脂肪乳剤中のリピッドマイクロスフェアが、導入遺伝子DNAに対しキャリアとしての役目を果たし、効率よく遺伝子DNAを癌(腫瘍)細胞等の細胞へ移送し、遺伝子導入ができ得ることを確認し、その結果本発明を完成させるに至ったのである。

【0006】

【課題を解決するための手段】しかして本発明は、遺伝子DNAを細胞内に導入する遺伝子DNAキャリア用脂肪乳剤に係り、具体的には、少なくとも以下の組成、

(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数8～12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6～18の脂肪酸のジエーおよびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、(d) 必要に応じ、コレステロール誘導体、および、(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤；を提供する。

【0007】本発明は、その目的とする脂肪乳剤を調製する成分の配合量において、より具体的には、(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数8～12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6～18の脂肪酸のジエーおよびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤：5～50%(W/V)、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤：0.05～25%(W/V)、(d) 必要に応じ、コレステロール誘導体：0.001～1%(W/V)、および、(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤；を提供する。

【0008】本発明は、前記した如く、(a)の導入遺伝子DNAを脂肪乳剤とした場合に、導入遺伝子DNAが脂肪乳剤を構成するリピッドマイクロスフェアに結合し、ex vivoにおいて試験内の細胞に遺伝子を導入することにおいて、さらにそのリピッドマイクロスフェアが腫瘍細胞などに移送され、その場で結合された遺伝子DNAが核内に入って、遺伝子の導入が行なわれ、遺伝子治療ができ得る点で特異的なものである。

【0009】

【発明の作用・効果】本発明が提供しようとする、個体に遺伝子DNAを導入する遺伝子DNAキャリア用脂肪乳剤において、リピッドマイクロスフェアに結合する

遺伝子DNAとしては、癌に関連する遺伝子DNA、先天性代謝異常に関連する遺伝子DNA、AIDSなどウイルス性疾患に関連する遺伝子DNA、各種サイトカインなど炎症や動脈硬化にかかわる生体内活性物質に関連する遺伝子DNAなど、各種遺伝子治療における遺伝子DNAであればどのようなものでもよい。具体的には、癌抑制遺伝子DNA、サイトカイン遺伝子DNA、同種抗原遺伝子DNA、薬剤感受性遺伝子DNA、多剤耐性遺伝子DNA等が挙げられる。より具体的な導入遺伝子DNAとしては、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、GM-CSF、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、PDGF (血小板由来成長因子)、ジフテリマトキシンA、HVS-tk、シトシンデアミナーゼの遺伝子DNAなど、従来から遺伝子治療に使用されている導入遺伝子DNAがあげられる。これらの導入遺伝子DNAは、いわゆるホスホロチオエート型などの合成オリゴヌクレオチドであるか、あるいは種々のベクターに組み込まれた構造遺伝子としてのものであり、センス配列あるいはアンチセンス配列のいずれであってよい。

【0010】本発明における、個体に遺伝子DNAを導入する遺伝子DNAキャリア用脂肪乳剤は、通常の脂肪乳剤であり、そのなかでもカチオン性の脂肪乳剤が好ましく、その脂肪乳剤と、遺伝子導入を行なおうとする遺伝子DNAとを混合することにより調製される。この場合、カチオン性の脂肪乳剤とするためには、上記(d)成分のコレステロール誘導体を配合してやれば良い。この混合により、導入遺伝子DNAは、脂肪乳剤を構成するリピッドマイクロスフェアの表面に結合し、リピッドマイクロスフェアがDNAのキャリアとして癌(腫瘍)細胞等に、*ex vivo*でも*in vivo*でも安全にかつ効率よく細胞内への導入が行われるのである。特に*in vivo*では、腫瘍細胞などに特異的に移送されて、さらに効率よく遺伝子DNAを導入できるのである。

【0011】したがって本発明は、その具体的態様において、(a)インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、GM-CSF、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、PDGF (血小板由来成長因子)、ジフテリマトキシンA、HVS-tk、シトシンデアミナーゼの遺伝子DNAから選択される1種の遺伝子DNA、

(b) 植物油、炭素原子数8~12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6~18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種

の脂肪乳剤基剤、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、(d) コレステロール誘導体、および、(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤；を提供する。

【0012】また本発明は、その別な具体的態様において、(a) インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、GM-CSF、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、PDGF (血小板由来成長因子)、ジフテリマトキシンA、HVS-tk、シトシンデアミナーゼの遺伝子DNAから選択される1種の遺伝子DNA、

(b) 植物油、炭素原子数8~12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6~18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、および、(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤；を提供する。

【0013】しかして、本発明の脂肪乳剤の調製に際して使用される脂肪乳剤基剤としては、従来からいわゆる脂肪乳剤の調製に際して通常用いられている製剤学的に許容される任意の油脂類が含まれる。具体的には、大豆油、綿実油、菜種油、サフラワー油などの植物油；通常MCTと略称されている炭素原子数8~12個の中鎖脂肪酸(例えば、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸など)のトリグリセリド；炭素原子数6~18個の脂肪酸(例えば、カロン酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、リノール酸、ステアリン酸など)のモノ-またはジグリセリド等が挙げられ、これらはそれぞれ単独または2種もしくはそれ以上の組み合わせで使用することができる。これらのなかでも、特に大豆油、バナセート810(日本油脂株式会社製、MCTの混合物)が好適に使用される。

【0014】これら脂肪乳剤基剤の使用量は厳密に制限されるものではなく、広範に変えることができるが、一般に、1~50% (W/V)、好ましくは3~30% (W/V)、より好ましくは5~20% (W/V) の範囲とするのが好都合である。なお、本明細書において、脂肪乳剤の配合成分の含量または使用量について使用する百分率「% (W/V)」は、特にことわらない限り、最終の脂肪乳剤100容量部あたりの重量部を意味する。

【0015】また、上記脂肪乳剤を水中に安定に分散させるための乳化剤としては、生理学的に許容されるリン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤が使用される。生理学的に許容されるリン脂質としては、例えば、卵黄リン脂質、大豆リン脂質、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノール

アミン等が挙げられる。また、非イオン系界面活性剤としては、例えば、ポリオキシアルキレン共重合体、(例えば、平均分子量が1,000~20,000の範囲のポリオキシエチレン-ポリオキシアルキレン誘導体;例えば、硬化ヒマシ油ポリオキシエチレン-(40)-エーテル、硬化ヒマシ油ポリオキシエチレン-(20)-エーテル)等が包含される。これらの乳化剤は、それぞれ単独で使用できるほか、2種あるいはそれ以上を併用し、使用してもよい。本発明で使用する乳化剤は、一般に、6~15、好ましくは10~14の範囲にあるHLBを持つことが好ましい。またその使用量としては、脂肪乳剤基剤を水中に安定に分散保持するのに必要な量で使用され、乳化剤の種類に応じるものの、一般的には0.05~25%(W/V)、好ましくは0.2~6%(W/V)、さらに好ましくは0.6~2.4%(W/V)の範囲であり、また、前記脂肪乳剤基剤を基準にすれば、該基剤100重量部当たり6~24重量部、特に、6~15重量部の範囲が好適である。

【0016】さらに本発明の脂肪乳剤において分散溶媒となる水としては蒸留水またはイオン交換水を適量使用することができ、場合によってはエタノールのような水混和性の有機溶媒を少量混合してもよい。

【0017】本発明の脂肪乳剤には、通常行なわれているように、必要に応じて、等張化剤、乳化助剤、安定化剤、pH調整剤等の添加剤をさらに含有させることができる。配合し得る等張化剤としては、例えば、グリセリン;ソルビトール、キシリトールなどの糖アルコール;ブドウ糖、果糖などの単糖類;マルトースのような二糖類;L-アラニン、L-バリン、グリシンなどのアミノ酸等が挙げられ、これらのなかから適宜1種またはそれ以上を選んで使用される。これらの等張化剤は、脂肪乳剤が体液の浸透圧とはほぼ同等になるように調製するために添加されるものであり、その量は脂肪乳剤中の最終濃度が一般に0.1~0.5mol/l、好ましくは0.25~0.35mol/lの範囲になるようなものである。

【0018】また、適宜配合し得る乳化補助剤としては、例えば、炭素原子数10~20個の脂肪酸(例えば、ステアリン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸など)およびその塩(例えばナトリウム塩、カリウム塩など)、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ステアリアルアミン等が挙げられ、これらは一般に、0.04%(W/V)までの範囲、好ましくは0.01~0.2%(W/V)の範囲で使用する事ができ、特に上記脂肪酸またはその塩は、0.01~0.1%(W/V)の範囲で、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ステアリアルアミンは0.05~0.3%(W/V)、特に0.1~0.2%(W/V)の範囲で有利に使用することができる。

【0019】さらに、安定化剤としてはコレステロールまたはトコフェロールを用いることができる。コレステ

ロールは一般には1.2%(W/V)まで、好ましくは0.2~0.4%(W/V)の範囲で使用するのが好ましい。

【0020】また、安定化剤としては、アルブミンまたはその脂肪酸アミド誘導体、多糖類またはその脂肪酸エステル誘導体等も使用することができる。アルブミンとしては、ヒト用の製剤を調製することより、抗原性の観点よりヒト由来のものが好ましく、その脂肪酸アミド誘導体としては、アルブミン中に存在する全アミノ基の5~40%を、炭素原子数14~18個の脂肪酸(例えば、パルミチン酸、ステアリン酸など)でアミド化したものが挙げられる。他方、多糖類としては、デキストラン、プルラン、ヒドロキシエチルデンプン等が包含され、これら脂肪酸エステル誘導体としては、当該多糖類に存在する全水酸基の5~40%を、炭素原子数14~18個の脂肪酸(例えば、パルミチン酸、ステアリン酸など)によりエステル化したものが挙げられる。これらの安定化剤は一般には0.02~5%(W/V)、好ましくは0.2~2.5%(W/V)の範囲で添加することができる。

【0021】本発明の脂肪乳剤は、通常の脂肪乳剤であり、そのなかでもカチオン性の脂肪乳剤が好ましい。カチオン性の脂肪乳剤とするには、乳剤処方においてコレステロール誘導体を加えるのが良く、かかるコレステロール誘導体としては、本発明の脂肪乳剤をカチオン性にするものであれば、一般的に使用されているコレステロール誘導体でよく、3β-(N-(N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル)コレステロール、2-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)エチルアミン等があげられる。その添加量は、0.001~10%(W/V)、好ましくは0.01~5%(W/V)、より好ましくは0.1~2%(W/V)である。

【0022】本発明の脂肪乳剤にあっては、脂肪乳剤中に占めるリビッドマイクロスフェアの濃度として、0.01~5%、好ましくは0.01~3%、さらに好ましくは0.01~1%の濃度で存在するのが、リビッドマイクロスフェアに対する導入遺伝子DNAの結合効率が良いことが判明した。したがって、上記してきた脂肪乳剤を構成する配合処方成分の配合量を適宜調製し、目的の濃度のリビッドマイクロスフェアを含有する脂肪乳剤とするのが良い。

【0023】また、脂肪乳剤中における遺伝子DNAのリビッドマイクロスフェアに対する配合量は、種々変更することができるが、一般的には、リビッドマイクロスフェア25~50μgに対し、1~20μgの遺伝子DNAを使用するのが良い。

【0024】本発明の脂肪乳剤は、それ自体公知の乳化方法により製造することができる。その際、乳化機としては通常ホモジナイザーを使用することができるが、安定で微細な脂肪乳剤を調製するためには、2種類のホ

モジナイザーを併用するのが良い。具体的な製法としては、通常の脂肪乳剤の調製においては、例えば、所定量の大豆油に、所定量の乳化剤、例えば精製卵黄リン脂質（精製卵黄レシチン）を加え、90℃にて5分間程度、15,000rpm条件下でホモジナイズする。次いで水および必要に応じて他の添加剤、例えば等張化剤としてのグリセリンを加え、90℃にて20分程度、20,000rpm条件下でホモジナイズする。かくして得られた乳化物を更にFrench Pressure Cell Pressで5回程度処理することにより脂肪乳剤を作製する。ついで、目的とする導入遺伝子DNA（オリゴヌクレオチド、または種々のベクターに組み込んだ構造遺伝子）を混合することにより、リビッドマイクロスフェアの表面に導入遺伝子DNAが結合した本発明の脂肪乳剤が調製される。

【0025】また、カチオン性の脂肪乳剤の調製においては、例えば、所定量の大豆油に、コレステロール誘導体、例えば3β-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル)コレステロールあるいは2-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)エチルアミン、および所定量の乳化剤、例えば精製卵黄リン脂質（精製卵黄レシチン）を加え、90℃にて5分間程度、15,000rpm条件下でホモジナイズする。次いで水および必要に応じて他の添加剤、例えば等張化剤としてのグリセリンを加え、90℃にて20分程度、20,000rpm条件下でホモジナイズすることにより乳化物を得た。次いでこの乳化物を、French Pressure Cell Pressを5回程度処理することにより、脂肪乳剤を作製する。目的とする導入遺伝子DNA（オリゴヌクレオチドまたは種々のベクターに組み込んだ構造遺伝子）を混合することにより、リビッドマイクロスフェアの表面に導入遺伝子DNAが結合した本発明の脂肪乳剤が調製される。

【0026】以下に本発明を、実施例に代わる試験例で詳細に説明する。なお、本発明は以下に記載の試験例に限定されるものでないことはいうまでもない。導入遺伝子としてインターロイキン-1β遺伝子の開始コドンを含む20量体のホスホロチオエート型アンチセンスDNAを用い、脂肪乳剤中のリビッドマイクロスフェアの表面に、アンチセンスDNAを結合させた具体的脂肪乳剤について検討した。

【0027】アンチセンスとは、標的となる塩基配列と相補的な配列を意味する。すなわち、二重鎖DNA構造遺伝子で、情報を読み取られる側のDNAをセンス、もう一方の相補的なDNAをアンチセンスという。したがって、タンパク質の遺伝情報を担うmRNAのセンス鎖のなかで、標的となる部分塩基配列に対して相補的なアンチセンス鎖を細胞内に導入して、その遺伝情報の発現を抑制して病因となるタンパク質産生を疎外して疾患を治療することができる（アンチセンス法）。インターロ

イキン-1β(IL-1β)は、炎症などの病態に中心的に関与するサイトカインであり、このIL-1βの産生を抑制すれば、慢性関節リウマチなどIL-1がかかわる病態を著しく改善できるものと期待される。

【0028】試験例1：リビッドマイクロスフェアは次のようにして作製した。大豆油1g、3β-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル)コレステロール2.4mgおよび卵黄レシチン117.6mgを90℃にて5分間、15,000rpm回転でホモジナイズした。次いで、このものに注射用蒸留水9mlおよびグリセリン0.25gを加え、90℃にて20分間、20,000rpmでホモジナイズした。得られた乳化物を、French Pressure Cell Pressを5回程度処理することにより、粒子径0.2μmのリビッドマイクロスフェアを作製した。ついで、上記方法で得たリビッドマイクロスフェアを用い、その0.01%、0.1%ならびに1%溶液（各、LM0.01%、LM0.1%、LM1%と表示する。）に、5'端を³²Pで標識したIL-1βのホスホロチオエート型アンチセンスDNAを混合し、リビッドマイクロスフェア表面に³²P標識アンチセンスDNAが結合した脂肪乳剤を作製した。このものを、ヒト単球系の細胞株、U937細胞に作用させ、その細胞内への遺伝子DNA(IL-1βアンチセンスDNA)の取り込みを観察した。その結果、図1に示すごとく、LM0.01%、LM0.1%、LM1%溶液は、コントロールに比較し、有意にIL-1βアンチセンスDNAであるオリゴヌクレオチドが取り込まれており、本発明の脂肪乳剤は、遺伝子の細胞内導入用キャリアすなわち、脂肪乳剤中のリビッドマイクロスフェアが、導入遺伝子DNAに対しキャリアとしての役目を果たしていることが理解される。

【0029】試験例2：試験例1で得たリビッドマイクロスフェアを用い、その0.01%（LM0.01%と表示する。）の脂肪乳剤を使用し、IL-1βアンチセンスDNAのオリゴヌクレオチドの添加混合量を変化（2、5、10、20μM）させ、IL-1β細胞株に作用させたのち、その細胞が実際にどの程度IL-1βの産生を抑制しているかを観察した。IL-1β産生細胞としては、前述のヒト単球系細胞株、U937細胞を使用した。U937細胞は、10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640培地中で2×10⁴/mlとし、12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetateを1ng/mlおよびlipopolysaccharideを1μg/ml加え、さらにIL-1βアンチセンスDNAの脂肪乳剤を加え、37℃にて24時間培養し、IL-1βの産生を測定した。その結果を図2に示した。図中の結果からも明らかな如く、本発明の脂肪乳剤（LM0.01%溶液）を用させた細胞は、遺伝子DNAの導入が行なわれた結

11

果、コントロールと比較し、有意にIL-1 β の産生を抑制していることが判明した。

【0030】以上の実験は、遺伝子DNAをオリゴヌクレオチドとしてリビッドマイクロスフェアの表面に結合させ、標的細胞と作用させ、細胞内に遺伝子DNAを導入させたものであるが、導入遺伝子DNAとしては、種々のベクターに組み込んだ構造遺伝子であってもよい。そこで、構造遺伝子が組み込まれたベクターの一つとしてpMAMneoを用い、本発明の脂肪乳剤を作製し、その導入効果を調べた。

【0031】試験例3：実験には、構造遺伝子が組み込まれたベクターとしてのpMAMneoは、ニックトランスレーション法による³²Pラベル化したものを使用した。ベクター濃度としてそれぞれ1、5、10、20 μ g/50 μ l蒸留水溶液を用いた。この溶液50 μ lを、蒸留水50 μ l、あるいは25、または50 μ gリビッドマイクロスフェア/50 μ l蒸留水と混合し、この各100 μ l混合溶液を室温にて30分間緩やかに混合したのち、細胞(CHO-K1)に滴下しながら加え、できるだけ均質にした。5%二酸化炭素雰囲気湿度*20

リビッドマイクロスフェアNo. 1 (5ml中)

大豆油 (脂肪乳剤基剤)	
ホスファチジルコリン	60mg
ジオレイルホスファチジル	
エタノールアミン	10mg
3 β {N-(N', N'-ジメチル	
アミノエタン) カルバモイル} コレステロール	10mg

リビッドマイクロスフェアNo. 2 (5ml中)

大豆油 (脂肪乳剤基剤)	
ホスファチジルコリン	60mg
ジオレイルホスファチジル	
エタノールアミン	10mg
2-(コレステリルオキシカルボニル	
アミノ) エチルアミン	10mg

【0033】上記で得たリビッドマイクロスフェアを1%溶液とした脂肪乳剤とし、そこに前記試験例3で使用する遺伝子ベクター(³²Pラベル化pMAMneo)と混合し、試験対象の脂肪乳剤を得た。この脂肪乳剤を試験例3に記載した方法と同様に処理し、細胞内に導入された遺伝子ベクターの放射活性を測定した。実験は、※40

12

*下、37℃にて4時間細胞を培養した。ついで、10%胎児血清含有のHAM培地に加え、上記条件下にて48時間培養した。培養後、細胞を5mlのPBSで2回洗浄し、細胞のDNAをエタノールで抽出し、DNAの放射活性を測定した。なお、リビッドマイクロスフェア濃度としては、0.01% (LM0.01%)、0.005% (LM0.005%) に該当するものである。また、対照として、in vivo法で汎用されているリポフェクチン(Lipofectin)の0.01%溶液を同様実験した。その結果を、図3に示す。図中の結果から明らかな如く、リビッドマイクロスフェア濃度として0.01%の本発明の脂肪乳剤(LM0.01%)で、そこにpMAMneoのベクター濃度が1、5、10、20 μ g/50 μ lで添加させた場合も、いずれも導入遺伝子ベクターが細胞内に効率よく導入されていることが理解できる。

【0032】試験例4：脂肪乳剤成分の変化による、導入遺伝子DNAの導入効果：以下に記載の成分ならびに配合量により、2種のリビッドマイクロスフェアを作製した。

※リビッドマイクロスフェア各群で遺伝子ベクターの混合量を変化させものとして、3回行なった。なお、コントロールとしては、脂肪乳剤に混合しないpMAMneoの放射活性をおいた。その結果を表1に示す。

【0034】

【表1】

表1：細胞に取り込まれたベクターの放射活性値

試験脂肪乳剤	放射活性値
リピッドマイクロスフェアNo. 1	2121.0
〃	2393.0
〃	1677.0
リピッドマイクロスフェアNo. 2	3110.0
〃	3154.0
〃	2653.0
コントロール	1627.0
〃	1806.0
〃	1714.0

【0035】表中の結果より明らかな如く、コントロール群に比較し、本発明の脂肪乳剤は、有意に遺伝子ベクターDNAを細胞内に取り込んでいることが判明する。

【発明の効果】

【0036】以上記載のように、本発明の脂肪乳剤は、導入遺伝子DNAを、脂肪乳剤中のリピッドマイクロスフェアに結合してやることにより、該リピッドマイクロスフェアがキャリアとなって、選択的に癌（腫瘍）細胞等に移送され、その場でリピッドマイクロスフェアに結合された遺伝子DNAが核内に入って、遺伝子の導入が行なわれており、有効な遺伝子治療法の確立がで

き得るものである。したがって、本発明は、難治性疾患*

20*患者に多大の光明を与えるものであり、その利用価値は優れたものであるといえる。

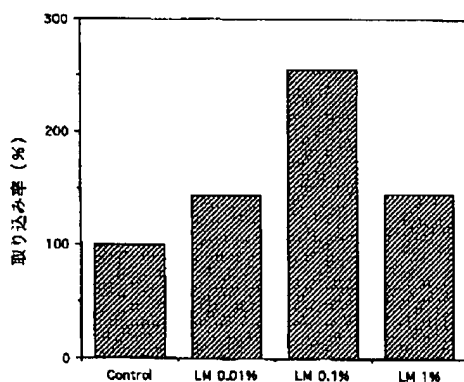
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の試験例1における細胞内への遺伝子DNA（IL-1 β アンチセンスDNA）の取り込み効果の結果を示す図である。

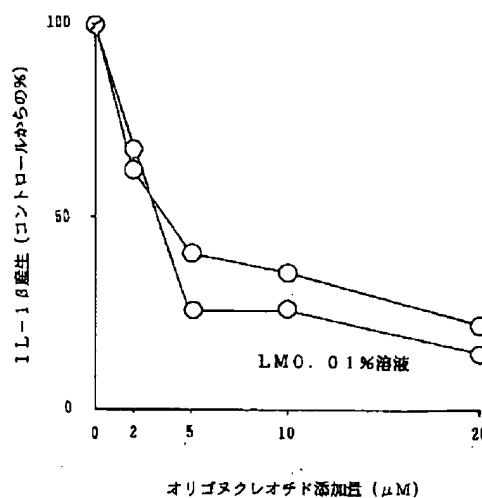
【図2】本発明の試験例2におけるIL-1 β の産生抑制効果の結果を示す図である。

【図3】本発明の試験例3におけるpMAMneoの遺伝子ベクターの細胞内取り込み効果の結果を示す図である。

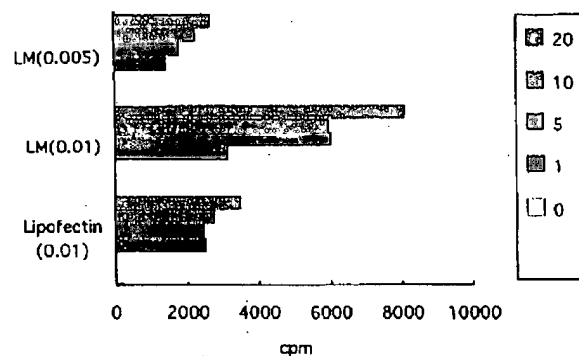
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 武永 美津子
神奈川県川崎市宮前区菅生2丁目16番1号
聖マリアンナ医科大学 難病治療研究セ
ンター内

(72)発明者 水島 裕
神奈川県川崎市宮前区菅生2丁目16番1号
聖マリアンナ医科大学 難病治療研究セ
ンター内

DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】 日本国特許庁 (J P)	(19)[ISSUING COUNTRY] Japanese Patent Office (JP)
(12)【公報種別】 公開特許公報 (A)	Laid-open (Kokai) patent application number (A)
(11)【公開番号】 特開平 7 - 3 3 0 6 1 4	(11)[UNEXAMINED PATENT NUMBER] Unexamined-Japanese-Patent 7-330614
(43)【公開日】 平成 7 年 (1 9 9 5) 1 2 月 1 9 日	(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION] December 19th, Heisei 7 (1995)
(54)【発明の名称】 遺伝子の細胞内導入用脂肪乳剤	(54)[TITLE] Fat emulsion for intracellular transduction of a gene
(51)【国際特許分類第 6 版】 A61K 31/70 9/107 E 48/00 C12N 15/09	(51)[IPC] A61K 31/709/107 E 48/00C12N 15/09
【 F I 】 C12N 15/00 A 9281-4B	[FI] C12N 15/00 A 9281-4B
【審査請求】 未請求	[EXAMINATION REQUEST] UNREQUESTED
【請求項の数】 1 2	[NUMBER OF CLAIMS] 12
【出願形態】 F D	[Application form] FD
【全頁数】 9	[NUMBER OF PAGES] Nine
(21)【出願番号】 特願平 6 - 1 4 2 2 1 7	(21)[APPLICATION NUMBER] Japanese-Patent-Application-No. 6-142217
(22)【出願日】	(22)[DATE OF FILING]

平成 6 年 (1 9 9 4) 6 月 2 日 June 2nd, Heisei 6 (1994)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

3 9 1 0 4 3 0 5 5

[ID CODE]

391043055

【氏名又は名称】

株式会社エルティーティー研究 所 K.K. LTT Kenkyusho

【住所又は居所】

神奈川県川崎市宮前区菅生 2 -
1 6 - 1

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 川合 眞一

Shinichi Kawai

【住所又は居所】

神奈川県川崎市宮前区菅生 2 丁
目 1 6 番 1 号 聖マリアンナ医
科大学 難病治療研究センター
内

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 八幡 直和

Naokazu Yawata

【住所又は居所】

神奈川県川崎市宮前区菅生 2 丁
目 1 6 番 1 号 聖マリアンナ医
科大学 難病治療研究センター
内

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 武永 美津子

Mitsuko Takenaga

【住所又は居所】

[ADDRESS]

神奈川県川崎市宮前区菅生2丁目16番1号 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター内

(72)【発明者】**【氏名】** 水島 裕**【住所又は居所】**

神奈川県川崎市宮前区菅生2丁目16番1号 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター内

(72)[INVENTOR]

Hiroshi Mizushima

[ADDRESS]**(57)【要約】****【目的】**

個体に遺伝子DNAを導入する、遺伝子の細胞内導入用脂肪乳剤に係り、脂肪乳剤中のリピッドマイクロスフェアが、導入遺伝子DNAに対しキャリアとして作用し、遺伝子導入ができる脂肪乳剤の提供。

【構成】

少なくとも以下の組成、(a)導入遺伝子DNA、(b)植物油、炭素原子数8～12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6～18の脂肪酸のジグリセリドおよびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、(c)リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、(d)必要に応じ、コレステロール誘導体、および、(e)水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤。

(57)[SUMMARY]**[OBJECT]**

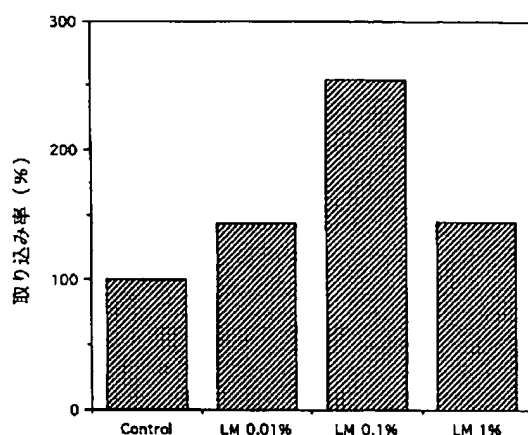
It is related with fat emulsion for intracellular transduction of a gene which transduces gene DNA for an individual.

The lipid microsphere in fat emulsion effects as a carrier to transducing-gene DNA.

A gene transfer is made. Provision of above fat emulsion.

[SUMMARY OF THE INVENTION]

They are the following compositions at least. (a) Transducing-gene DNA, (b) Fat emulsion base of at least one kind chosen from a vegetable oil, triglyceride of the medium chain triglyceride of 8-12 carbon atomic numbers, and the di- and monoglyceride of a fatty acid of the carbon atomic numbers 6-18, (c) The emulsifier of at least one kind chosen from the phospholipid and a nonionic surface active agent, (d) the cholesterol derivative depending on the need. And, (e) water, fat emulsion which consists of these and which transduces gene DNA for an individual.



Vertical axis: Uptake percentage (%)

【特許請求の範囲】

【CLAIMS】

【請求項 1】

少なくとも以下の組成、(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数 8 ～ 12 個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数 6 ～ 18 の脂肪酸のジエーおよびモノグリセリドから選択される少なくとも 1 種の脂肪乳剤基剤、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも 1 種の乳化剤、(d) 必要に応じ、コレステロール誘導体、および、(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤。

【CLAIM 1】

They are the following compositions at least. (a) Transducing-gene DNA, (b) Fat emulsion base of at least one kind chosen from a vegetable oil, triglyceride of the medium chain triglyceride of 8-12 carbon atomic numbers, and the di- and monoglyceride of a fatty acid of the carbon atomic numbers 6-18, (c) The emulsifier of at least one kind chosen from the phospholipid and a nonionic surface active agent, (d) the cholesterol derivative depending on the need. And, (e) water, fat emulsion which consists of these and which transduces gene DNA for an individual.

【請求項 2】

請求項 1 記載の脂肪乳剤であって、少なくとも、(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数 8 ～ 12 個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数 6 ～ 18 の脂肪酸のジエーお

【CLAIM 2】

It is fat emulsion of Claim 1, comprised such that at least, it is (a) transducing-gene DNA. (b) Fat emulsion base of at least one kind chosen from a vegetable oil, triglyceride of the medium chain triglyceride of 8-12 carbon atomic numbers, and the di- and monoglyceride of a fatty acid of the carbon atomic numbers 6-18 :

よびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤
基剤：5～50% (W/V)、

(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤：0.05～25% (W/V)、(d) コレステロール誘導体：0.001～1% (W/V)、および、

(e) 水、からなる、請求項1記載の脂肪乳剤。

【請求項3】

請求項1記載の脂肪乳剤であって、少なくとも、(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数8～12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6～18の脂肪酸のジエーおよびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤
基剤：5～50% (W/V)、

(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤：0.05～25% (W/V)、および、

(e) 水、からなる、請求項1記載の脂肪乳剤。

【請求項4】

導入遺伝子DNAが、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、GM-CSF、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、PDGF (血小板由来成長因子)、ジフテリアトキシンA、HVS-tk、シトシンデアミ

5-50% (W/V), (c) Emulsifier of at least one kind chosen from the phospholipid and a nonionic surface active agent :0.05-25% (W/V) (d) Cholesterol derivative : 0.001-1% (W/V), And, (e) water, Fat emulsion of Claim 1 which consists of these.

【CLAIM 3】

It is fat emulsion of Claim 1, comprised such that at least, it is (a) transducing-gene DNA. (b) Fat emulsion base of at least one kind chosen from a vegetable oil, triglyceride of the medium chain triglyceride of 8-12 carbon atomic numbers, and the di- and monoglyceride of a fatty acid of the carbon atomic numbers 6-18 : 5-50% (W/V), (c) The emulsifier of at least one kind chosen from the phospholipid and a nonionic surface active agent : 0.05-25% (W/V), And, (e) water, fat emulsion of Claim 1 which consists of these.

【CLAIM 4】

Fat emulsion of Claim 1 whose transducing-gene DNA is 1 sort of gene DNA chosen from gene DNA of an interleukin- 1 (IL-1), the interleukin- 2 (IL-2), the interleukin- 4 (IL-4), the interleukin- 6 (IL-6), the interleukin- 7 (IL-7), GM-CSF, a tumor necrosis factor (TNF- α), an interferon- γ (IFN- γ), PDGF (platelet-derived growth factor), diphtheria-toxin A, HVS-tk, and cytosine deaminases.

ナーゼの遺伝子DNAから選択される1種の遺伝子DNAである、請求項1記載の脂肪乳剤。

【請求項5】

少なくとも以下の組成、(a)インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、GM-CSF、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、PDGF (血小板由来成長因子)、ジフテリアトキシンA、HVS-tk、シトシンデアミナーゼの遺伝子DNAから選択される1種の遺伝子DNA、(b)植物油、炭素原子数8~12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6~18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、(c)リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、(d)必要に応じ、コレステロール誘導体、および、(e)水、からなる、請求項2または3記載の脂肪乳剤。

【請求項6】

植物油が大豆油である、請求項5記載の脂肪乳剤。

【請求項7】

リン脂質が大豆リン脂質または卵黄リン脂質である請求項5記載の脂肪乳剤。

[CLAIM 5]

At least following compositions, (a) the interleukin-1 (IL-1), the interleukin-2 (IL-2), the interleukin-4 (IL-4), the interleukin-6 (IL-6), the interleukin-7 (IL-7), GM-CSF, tumor necrosis factor (TNF- α), An interferon- γ (IFN- γ), PDGF (platelet-derived growth factor), diphtheria-toxin A, HVS-tk, gene DNA of cytosine deaminases. 1 sort of gene DNA chosen from an above, (b) The fat emulsion base of at least one kind chosen from a vegetable oil, triglyceride of the medium chain triglyceride of 8-12 carbon atomic numbers, and the di- and monoglyceride of a fatty acid of the carbon atomic numbers 6-18, (c) The emulsifier of at least one kind chosen from the phospholipid and a nonionic surface active agent, (d) the cholesterol derivative depending on the need. And, (e) water, Fat emulsion of Claims 2 or 3 which consists of these.

[CLAIM 6]

Fat emulsion of Claim 5 whose vegetable oil is a soy bean oil.

[CLAIM 7]

Fat emulsion of Claim 5 whose phospholipid is the soybean phospholipid or yolk phospholipid.

【請求項 8】

コレステロール誘導体が、 3β {N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル}コレステロールまたは2-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)エチルアミンである、請求項 5 記載の脂肪乳剤。

【請求項 9】

グリセリン、糖アルコール、単糖類、二糖類およびアミノ酸から選択される少なくとも 1 種の等張化剤をさらに含有する、請求項 5 記載の脂肪乳剤。

【請求項 10】

炭素原子数 10～20 の脂肪酸およびその塩、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリンおよびステアリルアミンから選択される少なくとも 1 種の乳化補助剤をさらに含有する、請求項 5 記載の脂肪乳剤。

【請求項 11】

コレステロールおよびトコフェロールから選択される安定化剤をさらに含有する、請求項 5 記載の脂肪乳剤。

【請求項 12】

アルブミンおよびその脂肪酸アミド誘導体ならびに多糖類およびその脂肪酸エステル誘導体から選択される少なくとも 1 種の安定化剤をさらに含有する、請求項 5 記載の脂肪乳剤。

【発明の詳細な説明】**[CLAIM 8]**

Fat emulsion of Claim 5 whose cholesterol derivative is 3β {N-(N',N'-dimethyl aminoethane) carbamoyl} cholesterol or 2-(cholesteryl oxycarbonyl amino) ethylamine.

[CLAIM 9]

Fat emulsion of Claim 5 which contains further the isotonicizing agent of at least one kind chosen from glycerol, a sugar alcohol, the monosaccharide, the disaccharide, and an amino acid.

[CLAIM 10]

Fat emulsion of Claim 5 containing the emulsification adjuvant of at least one kind chosen from the fatty acid of the carbon atomic numbers 10-20 and an its salt, the phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine, and a stearyl amine.

[CLAIM 11]

Fat emulsion of Claim 5 which contains further the stabilizer chosen from cholesterol and a tocopherol.

[CLAIM 12]

Fat emulsion of Claim 5 which contains further the stabilizer of at least one kind chosen from the albumin, its fatty-acid amide derivative, a polysaccharide, and its fatty-acid-ester derivative.

[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、個体に遺伝子DNAを導入する、遺伝子の細胞内導入用脂肪乳剤に係り、詳細には、遺伝子治療において患者の細胞に外来遺伝子を導入することによって疾患の治療を行なうため、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子工学の進歩により、疾患の分子レベルでの病態学的側面や、その原因遺伝子が解明され、体細胞を遺伝子レベルで改変し、難治性疾患の治療に役立たせようとする、いわゆる遺伝子治療の試みが最近注目を浴びてきている。例えば、一部の癌は遺伝子異常により引き起こされ、様々な遺伝子異常を蓄積した遺伝子病と考えられるが、仮にこれらの遺伝子異常を修復することができるものであれば、癌を治癒することができる。しかしながら、遺伝子工学が進歩したといっても、現在の遺伝子操作は未熟なものであり、正確かつ高率に、遺伝子を特定の細胞あるいはDNA上の特定の部位に挿入することはできない。したがって、このような背景のもとに、欧米、特にアメリカにおいては遺伝子治療の試みがしだいに多く行なわれてきている

[0001]

[INDUSTRIAL APPLICATION]

This invention relates to fat emulsion for intracellular transduction of a gene which transduces gene DNA for an individual.

In order to perform the treatment of the illness by transducing a foreign gene into a patient's cell in a gene therapy in detail, it is related with fat emulsion which transduces gene DNA for an individual.

[0002]

[PRIOR ART]

By advance of the genetic engineering, the illness-condition study-side and its cause gene in a molecular level of the illness are clarified. The trial of the so-called gene therapy which is going to modify somatic cells on a gene level and it is going to utilize for the treatment of the intractable illness has been recently exposed to attention.

For example, some cancer are caused by the abnormality in a gene and considered to be the gene disease which stored various abnormality in a gene.

However, cancer can be recovered supposing these abnormality in a gene is restorable.

However, although the genetic engineering advanced, present genetic engineering is unripe.

A gene cannot be inserted in exact and high rate at the specific site on a specific cell or DNA.

Therefore, in the West, especially an America, many trial of a gene therapy is being gradually performed on such a basis of a background.

However, it is a gene therapy as an experimental medical treatment to the last.

Fatal illness patients, such as fatal advance cancer, AIDS, and an inborn error of

ものの、あくまで実験的医療としての遺伝子治療であり、その対象には、致命的な進行癌、AIDS、先天性代謝異常などの致命的疾患患者が選ばれ、その遺伝子治療効果の有効性が期待されている現状である。

【0003】

しかしながら、遺伝子を正確に、また確実に特定の細胞あるいはDNA上の特定部位に挿入することができれば、遺伝子治療の有用性が確立し、難治病疾患患者に多大の光明を与えるものである。その第一歩は、遺伝子DNAを細胞内に効率よく安全に導入することであるといえる。これまでに確立している遺伝子治療の方法としては、遺伝子導入細胞を患者に移植する方法（ex vivo法）と、細胞を介さずに直接個体に遺伝子自体を注入する方法（in vivo法）の2方法がある。この場合、in vivo法は、標的細胞の採取、分離、保存、培養、移植などの操作を必要としないという点で、施行し易い利点を有しているが、ex vivo法の方が、目的とする細胞への遺伝子導入がより確実にできることより、現時点において広く採用されている。特に、ex vivo法における遺伝子導入に際しては、ウイルス・ベクターを用いる方法が主流を占め、レトロウイルス・ベクター、アデノウイルス・ベクター、アデノ関連ウイルス・ベクター等が挙げられる。これらのなかでも特に、レトロウイルス・ベク

metabolism, are chosen as the object. It is the present condition that effectiveness of the gene-therapy effect is anticipated.

[0003]

However, if a gene can be correctly inserted in the specific site on a reliably specific cell or DNA, the usefulness of a gene therapy will be established.

A great light is given to an incurable-disease illness patient.

It can be said that the first step is transducing gene DNA safely intracellularly efficiently.

As the method of the gene therapy established until now, there are method (ex vivo method) of transplanting a gene-transfer cell to a patient, and the two method of the method (in vivo method) of injecting the gene itself for a individual directly, without minding a cell.

In this case, in vivo method has the advantage which is easy to enforce in that operation of extraction of the target cell, an isolation, preservation, a culture, a transplant, etc. is not needed.

However, ex vivo method is widely adopted in this time from the gene transfer to the cell made into the objective being made more reliably.

Especially, in case of the gene transfer in ex vivo method, the method using a virus * vector occupies the mainstream, and a retrovirus * vector, an adenovirus * vector, an adeno related virus * vector, etc. are mentioned.

Especially about a retrovirus * vector, among them, From the long expression period of the safety and a transducing gene having been confirmed almost, the characteristic of these retrovirus * vector is used and it has been used widely as a transduction method in ex vivo method.

ターについては、その安全性と導入遺伝子の長い発現期間がほぼ確認されてきたことより、これらレトロウイルス・ベクターの性状を生かして、*ex vivo*法における導入法として汎用されてきている。

【0004】

しかしながら、最近急速に研究が行なわれてきた細胞ターゲティング法が確立すれば、遺伝子治療の主流は、*in vivo*法に変わっていくものと考えられる。かかる考え方を採用した方法として、遺伝子DNAそのものに細胞親和性を持つ物質を結合させるか、または細胞親和性を持つ物質でくるむか、あるいは結合させた人工の粒子を作り、それを細胞内に導入する方法がある。たとえば、*in vitro*で遺伝子DNAと適当な脂質、例えばリン脂質とを混合し、超音波処理すると、DNAを含んだ小胞体、すなわちリポソームができる。また、すでに作製したリポソームにDNAを添加し、電荷により結合させることができる。これらのリポソームを細胞へ与えて接触させると、リポソーム膜と細胞膜は融合して、リポソーム内のDNAは細胞へ移行する。さらに一部のDNAは核内へ入って遺伝子の導入が行なわれるのである。

【0005】

【発明が解決しようとする課

[0004]

However, if the cell target method to which research has been performed quickly recently is established, it will be considered that the mainstream of a gene therapy changes to *in vivo* method.

As the method of having adopted such idea, the material which has cell affinity in gene DNA itself is made to connect. Or it covers by the material with cell affinity. Or the artificial particle made to connect is made and it is transduced intracellularly. There is the above method.

For example, if gene DNA and the suitable lipid, for example, phospholipid, are mixed by *in vitro* and an ultrasonication is carried out, the vesicle containing DNA, i.e., liposome, will be made.

Moreover, DNA is added to the liposome already produced.

It can be made to connect with an electric charge.

If these liposome are made to give and contact to a cell, a liposome film and a cytoplasmic membrane will unite.

DNA in a liposome is transferred to a cell.

Furthermore partial DNA enters into a nucleus and transduction of a gene is performed.

[0005]

[PROBLEM ADDRESSED]

題】

本発明者らは、上記の遺伝子治療におけるリポソームに代わる遺伝子導入技法として、脂肪小粒子（リピッドマイクロスフェア）を用いたDDS（ドラッグデリバリーシステム）に着目した。この方法を用いれば、*ex vivo*においても、また *in vivo*においても、安全にまた効率よく遺伝子DNAを細胞内に導入し得ることが期待される。すなわち、導入遺伝子DNAを、脂肪乳剤中のリピッドマイクロスフェアに結合してやれば、該リピッドマイクロスフェアがキャリアとなつて、選択的に癌（腫瘍）細胞等に移送され、その場でリピッドマイクロスフェアに結合された遺伝子DNAが核内に入つて、遺伝子の導入が行なわれ、有効な遺伝子治療法の確立ができ得るものと考えられる。その点について本発明者らは鋭意検討を加えた結果、脂肪乳剤中のリピッドマイクロスフェアが、導入遺伝子DNAに対しキャリアとしての役目を果たし、効率よく遺伝子DNAを癌（腫瘍）細胞等の細胞へ移送し、遺伝子導入ができ得ることを確認し、その結果本発明を完成させるに至つたのである。

【0006】

【課題を解決するための手段】
しかして本発明は、遺伝子DNAを細胞内に導入する遺伝子DNAキャリア用脂肪乳剤に係

The present inventors directed his attention to DDS (drug-delivery system) using fat small grain (lipid microsphere) as a gene-transfer technique replaced with the liposome in the gene therapy of an above.

If this method is used, also in *ex vivo* and in *vivo*, it is anticipated that gene DNA can be transduced intracellularly efficiently again safely.

That is, if transducing-gene DNA is connect to the lipid microsphere in fat emulsion, This lipid microsphere serves as a carrier and is selectively transferred to a cancer (tumor) cell etc. Gene DNA connected by the lipid microsphere on that occasion enters in a nucleus, and transduction of a gene is performed. It is considered that establishment of an effective gene-therapy method may be able to be performed.

The present inventors added examination zealously about the point.

As a result, the lipid microsphere in fat emulsion achieves the role as a carrier to transducing-gene DNA.

Gene DNA is efficiently transferred to cells, such as a cancer (tumor) cell.

It confirms that a gene transfer may be made. It was made to come to perfect this invention as a result.

[0006]

[SOLUTION OF THE INVENTION]

However, this invention relates to fat emulsion for gene DNA carriers which transduces gene DNA intracellularly.

Specifically, the following compositions at least,

り、具体的には、少なくとも以下の組成、(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数8～12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6～18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、(d) 必要に応じ、コレステロール誘導体、および、(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤；を提供する。

【0007】

本発明は、その目的とする脂肪乳剤を調製する成分の配合量において、より具体的には、(a) 導入遺伝子DNA、(b) 植物油、炭素原子数8～12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6～18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤：5～50% (W/V)、(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤：0.05～25% (W/V)、(d) 必要に応じ、コレステロール誘導体：0.001～1% (W/V)、および、(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤；を提供する。

【0008】

本発明は、前記した如く、(a) の導入遺伝子DNAを脂肪乳剤とした場合に、導入遺伝子DNA

(a) Transducing-gene DNA, (b) Fat emulsion base of at least one kind chosen from a vegetable oil, triglyceride of the medium chain triglyceride of 8-12 carbon atomic numbers, and the di- and monoglyceride of a fatty acid of the carbon atomic numbers 6-18, (c) The emulsifier of at least one kind chosen from the phospholipid and a nonionic surface active agent, (d) the cholesterol derivative depending on the need, And, (e) water, fat emulsion which consists of these and which transduces gene DNA for a individual;

These are provided.

[0007]

This invention, in the compounding quantity of a component which prepares fat emulsion set into the objective more specifically, (a) Transducing-gene DNA, (b) Fat emulsion base of at least one kind chosen from a vegetable oil, triglyceride of the medium chain triglyceride of 8-12 carbon atomic numbers, and the di- and monoglyceride of a fatty acid of the carbon atomic numbers 6-18 : 5-50% (W/V), (c) The emulsifier of at least one kind chosen from the phospholipid and a nonionic surface active agent : 0.05-25% (W/V), (d) the cholesterol derivative depending on the need : 0.001-1% (W/V), And, (e) water, Fat emulsion which consists of these and which transduces gene DNA for a individual; These are provided.

[0008]

This invention, As described above, when transducing-gene DNA of (a) is used as fat emulsion, in transducing-gene DNA connecting

Aが脂肪乳剤を構成するリピッドマイクロスフェアに結合し、*ex vivo*において試験内の細胞に遺伝子を導入することにおいて、さらにそのリピッドマイクロスフェアが腫瘍細胞などに移送され、その場で結合された遺伝子DNAが核内に入って、遺伝子の導入が行なわれ、遺伝子治療ができ得る点で特異的なものである。

【0009】

【発明の作用・効果】

本発明が提供しようとする、個体に遺伝子DNAを導入する遺伝子DNAキャリア用脂肪乳剤において、リピッドマイクロスフェアに結合する遺伝子DNAとしては、癌に関連する遺伝子DNA、先天性代謝異常に関連する遺伝子DNA、AIDSなどウイルス性疾患に関連する遺伝子DNA、各種サイトカインなど炎症や動脈硬化にかかわる生体内活性物質に関連する遺伝子DNAなど、各種遺伝子治療における遺伝子DNAであればどのようなものでもよい。具体的には、癌抑制遺伝子DNA、サイトカイン遺伝子DNA、同種抗原遺伝子DNA、薬剤感受性遺伝子DNA、多剤耐性遺伝子DNA等が挙げられる。より具体的な導入遺伝子DNAとしては、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、イ

to the lipid microsphere which constitutes fat emulsion, and transducing a gene into the cell in an examination in *ex vivo* Furthermore the lipid microsphere is transferred to the oncocyte etc., gene DNA connected on that occasion enters in a nucleus, transduction of a gene is performed, and a gene therapy may be made. It is specific in respect of an above.

[0009]

[The effect * effect of invention]

In fat emulsion for gene DNA carriers which this invention tends to provide and which transduces gene DNA for a individual, As gene DNA connected to a lipid microsphere, Gene DNA relevant to cancer, gene DNA relevant to an inborn error of metabolism, AIDS etc. gene DNA relevant to the viral illness, Gene DNA relevant to the active substance in the living body in connection with inflammation, such as various cytokine, or arteriosclerosis etc., Any things are good if it is gene DNA in various gene therapies.

Specifically, cancer suppression gene DNA, cytokine gene DNA, alloantigen gene DNA, medical-agent sensitivity gene DNA, multiple-drug-resistance gene DNA, etc. are mentioned.

As more specific transducing-gene DNA, An interleukin- 1 β (IL-1 β), An interleukin- 2 (IL-2), the interleukin- 4 (IL-4), An interleukin- 6 (IL-6), the interleukin- 7 (IL-7), GM-CSF, a tumor necrosis factor (TNF- α), an interferon- γ (IFN- γ), PDGF (platelet-derived growth factor), diphtheria-toxin A, HVS-tk, Gene DNA of cytosine deaminases etc., Transducing-gene DNA currently conventionally used to the gene therapy is mentioned.

These transducing-gene DNA is synthetic oligonucleotide, such as the so-called phosphorothioate type. Or it is a thing as structural gene integrated in the various vector.

ンターロイキン-7 (IL-7)、GM-CSF、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、PDGF (血小板由来成長因子)、ジフテリアトキシンA、HVS-tk、シトシンデアミナーゼの遺伝子DNAなど、従来から遺伝子治療に使用されている導入遺伝子DNAがあげられる。これらの導入遺伝子DNAは、いわゆるホスホロチオエート型などの合成オリゴヌクレオチドであるか、あるいは種々のベクターに組み込まれた構造遺伝子としてのものであり、センス配列あるいはアンチセンス配列のいずれであってもよい。

【0010】

本発明における、個体に遺伝子DNAを導入する遺伝子DNAキャリア用脂肪乳剤は、通常の脂肪乳剤であり、そのなかでもカチオン性の脂肪乳剤が好ましく、その脂肪乳剤と、遺伝子導入を行なおうとする遺伝子DNAとを混合することにより調製される。この場合、カチオン性の脂肪乳剤とするためには、上記(d)成分のコレスレロール誘導体を配合してやれば良い。この混合により、導入遺伝子DNAは、脂肪乳剤を構成するリピッドマイクロスフェアの表面に結合し、リピッドマイクロスフェアがDNAのキャリアとして癌(腫瘍)細胞等に、*ex vivo*でも*in vivo*でも安全にかつ効率よく細胞内への導入が行われるのである。特に*in vivo*では、

Any of a sense sequence or an anti sense sequence are sufficient.

[0010]

Fat emulsion for gene DNA carriers in this invention which transduces gene DNA for an individual is usual fat emulsion.

Fat emulsion of a cationic is among them desirable. It is prepared by mixing the fat emulsion and gene DNA which is going to perform a gene transfer.

In this case, what is sufficient is just to compound the cholesterol derivative of an above (d) component, in order to consider as fat emulsion of a cationic.

With this mixing, transducing-gene DNA is connected on the surface of the lipid microsphere which constitutes fat emulsion. The transduction to intracellular is performed a lipid microsphere into a cancer (tumor) cell etc. safely and efficiently also by *ex vivo* or *in vivo* as a carrier of DNA.

It transfers specifically to the oncocyte etc. especially *in vivo*, and gene DNA can be transduced further efficiently.

腫瘍細胞などに特異的に移送されて、さらに効率よく遺伝子DNAを導入できるのである。

【0011】

したがって本発明は、その具体的な態様において、(a)インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、GM-CSF、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、PDGF (血小板由来成長因子)、ジフテリアトキシンA、HVS-tk、シトシンデアミナーゼの遺伝子DNAから選択される1種の遺伝子DNA、

(b) 植物油、炭素原子数8~12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6~18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、

(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、(d) コレステロール誘導体、および、

(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤；を提供する。

【0012】

また本発明は、その別な具体的な態様において、(a)インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7

[0011]

Therefore this invention, in the concrete aspect, (a) interleukin- 1 (IL-1), an interleukin- 2 (IL-2), the interleukin- 4 (IL-4), An interleukin- 6 (IL-6), the interleukin- 7 (IL-7), GM-CSF, a tumor necrosis factor (TNF- α), an interferon- γ (IFN- γ), PDGF (platelet-derived growth factor), diphtheria-toxin A, HVS-tk, gene DNA of cytosine deaminases 1 sort of gene DNA chosen from an above, (b) The fat emulsion base of at least one kind chosen from a vegetable oil, triglyceride of the medium chain triglyceride of 8-12 carbon atomic numbers, and the di- and monoglyceride of a fatty acid of the carbon atomic numbers 6-18, (c) The emulsifier of at least one kind chosen from the phospholipid and a nonionic surface active agent, (d) Cholesterol derivative, And, (e) water, Fat emulsion which consists of these and which transduces gene DNA for a individual; These are provided.

[0012]

Moreover this invention, in the another concrete aspect, (a) interleukin- 1 (IL-1), an interleukin- 2 (IL-2), the interleukin- 4 (IL-4), An interleukin- 6 (IL-6), the interleukin- 7 (IL-7), GM-CSF, a tumor necrosis factor (TNF- α), an interferon- γ (IFN- γ), PDGF (platelet-derived growth factor), diphtheria-toxin A, HVS-tk, gene DNA of cytosine deaminases 1 sort of gene DNA

(IL-7)、GM-CSF、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、PDGF (血小板由来成長因子)、ジフテリアトキシンA、HVS-tk、シトシンデアミナーゼの遺伝子DNAから選択される1種の遺伝子DNA、

(b) 植物油、炭素原子数8~12個の中鎖脂肪酸のトリグリセリドならびに炭素原子数6~18の脂肪酸のジ-およびモノグリセリドから選択される少なくとも1種の脂肪乳剤基剤、

(c) リン脂質および非イオン系界面活性剤から選択される少なくとも1種の乳化剤、および、

(e) 水、からなる、個体に遺伝子DNAを導入する脂肪乳剤；を提供する。

[0013]

しかし、本発明の脂肪乳剤の調製に際して使用される脂肪乳剤基剤としては、従来からいわゆる脂肪乳剤の調製に際して通常用いられている製剤学的に許容される任意の油脂類が包含される。具体的には、大豆油、綿実油、菜種油、サフラワー油などの植物油：通常MCTと略称されている炭素原子数8~12個の中鎖脂肪酸（例えば、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸など）のトリグリセリド；炭素原子数6~18個の脂肪酸（例えば、カプロン酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、リノール酸、ステアリン酸など）のモノ-またはジグリセリド等が挙げられ、これらはそれぞれ単独または2種もし

chosen from an above, (b) The fat emulsion base of at least one kind chosen from a vegetable oil, triglyceride of the medium chain triglyceride of 8-12 carbon atomic numbers, and the di- and monoglyceride of a fatty acid of the carbon atomic numbers 6-18, (c) The emulsifier of at least one kind chosen from the phospholipid and a nonionic surface active agent, And, (e) water, Fat emulsion which consists of these and which transduces gene DNA for a individual; These are provided.

[0013]

However, as a fat emulsion base used in case of manufacture of fat emulsion of this invention, the pharmacologically permissible arbitrary fats and oils conventionally usually used in case of manufacture of so-called fat emulsion are included.

Specifically, they are vegetable oils, such as a soy bean oil, cottonseed oil, rapeseed oil, and the safflower oil. : Usually triglyceride of the medium chain triglycerides of 8-12 carbon atomic numbers which it abbreviates with MCT (for example, the caprylic acid, a capric acid, lauric acid, etc.);

~~Mono-~~ or the di- glyceride of the fatty acids of 6-18 carbon atomic numbers etc. (for example, a caproic acid, a capric acid, the myristic acid, a palmitic acid, a linoleic acid, stearic acid, etc.) is mentioned. These are each independent or can be used in the combination of 2 sorts or more.

Also in these, especially a soy bean oil, Panasate 810 (made in Nippon Oil & Fats Co., Ltd., blend of MCT) are used suitably.

くはそれ以上の組み合わせで
使用することができる。これら
なかでも、特に大豆油、パナセ
ート 810（日本油脂株式会社
製、MCT の混合物）が好適に
使用される。

【0014】

これら脂肪乳剤基剤の使用量は
厳密に制限されるものではな
く、広範に変えることができ
るが、一般に、1～50% (W/
V)、好ましくは3～30% (W/
V)、より好ましくは5～20% (W/V) の範囲とするの
が好都合である。なお、本明細
書において、脂肪乳剤の配合成
分の含量または使用量について
使用する百分率「% (W/V)」
は、特にことわらない限り、最
終の脂肪乳剤100容量部あた
りの重量部を意味する。

【0015】

また、上記脂肪乳剤を水中に安
定に分散させるための乳化剤と
しては、生理学的に許容される
リン脂質および非イオン系界面
活性剤から選択される少なくと
も1種の乳化剤が使用される。
生理学的に許容されるリン脂質
としては、例えば、卵黄リン脂
質、大豆リン脂質、ホスファチ
ジルコリン、ホスファチジルエ
タノールアミン等が挙げられ
る。また、非イオン系界面活性
剤としては、例えば、ポリオキ
シアルキレン共重合体、(例え
ば、平均分子量が1,000～
20,000の範囲のポリオキ
シエチレンーポリオキシアルキ
レン誘導体；例えば、硬化ヒマ

[0014]

The amount of these fat emulsion base used is not limited strictly, and can be changed extensively.

However generally it is 1-50% (W/V), Preferably, it is 3-30% (W/V).

It is 5-20% (W/V) more preferable. Considering as the range of an above is convenient.

In addition, in this description, especially the percentage "% (W/V)" used about the content or the amount used of a blending component of the fat emulsion used implies the weight part per last fat emulsion 100 part by volumes, unless it refuses.

[0015]

Moreover, as an emulsifier for distributing above fat emulsion stable to water, the emulsifier of at least one kind chosen from the physiologically acceptable phospholipid and a nonionic surface active agent is used.

As the physiologically acceptable phospholipid, for example, the yolk phospholipid, the soybean phospholipid, the phosphatidylcholine, the phosphatidylethanolamine, etc. are mentioned. Moreover, as a nonionic surface active agent, For example, a polyoxyalkylene copolymer (for example, polyoxy ethylene- polyoxyalkylene derivative of the range of mean molecular weights 1,000-20,000 ;

For example, hydrogenated castor oil polyoxy ethylene- (40)-ether, hydrogenated castor oil polyoxy ethylene- (20)-ether, etc.) are included. These emulsifiers can each be used independently, and also they may use together

シ油ポリオキシエチレンー（４０）ーエーテル、硬化ヒマシ油ポリオキシエチレンー（２０）ーエーテル）等が包含される。これらの乳化剤は、それぞれ単独で使用できるほか、２種あるいはそれ以上を併用し、使用してもよい。本発明で使用する乳化剤は、一般に、６～１５、好ましくは１０～１４の範囲にあるＨＬＢを持つことが好ましい。またその使用量としては、脂肪乳剤基剤を水中に安定に分散保持するのに必要な量で使用され、乳化剤の種類に応じるものの、一般的には０．０５～２５％（Ｗ／Ｖ）、好ましくは０．２～６％（Ｗ／Ｖ）、さらに好ましくは０．６～２．４％（Ｗ／Ｖ）の範囲であり、また、前記脂肪乳剤基剤を基準にすれば、該基剤１００重量部当たり６～２４重量部、特に、６～１５重量部の範囲が好適である。

【００１６】

さらに本発明の脂肪乳剤において分散溶媒となる水としては蒸留水またはイオン交換水を適量使用することができ、場合によってはエタノールのような水混和性の有機溶媒を少量混合してもよい。

【００１７】

本発明の脂肪乳剤には、通常行なわれているように、必要に応じて、等張化剤乳化助剤、安定化剤、ｐＨ調製剤等の添加剤をさらに含有させることができる。配合し得る等張化剤としては、例えば、グリセリン；ソル

and use 2 sorts or more.

As for the emulsifier used with this invention, it is preferable to have generally HLB in the range of 6-15, preferably 10-14.

Moreover as the amount used, it uses to carrying out distributed holding of the fat emulsion base stably to water by the needed amount, and it responds to the kind of emulsifier.

However generally it is 0.05-25% (W/V), Preferably, it is 0.2-6% (W/V).

More preferably, it is 0.6-2.4% (W/V) of the range.

Moreover, if based on the above-mentioned fat emulsion base, the range of 6-24 weight-parts, especially 6-15 weight-parts per 100 weight-parts of these bases are suitable.

[0016]

Furthermore as water which serves as distributed solvent in fat emulsion of this invention, distilled water or an ion-exchange-water suitable quantity can be used. By the case, the organic-solvent small amount of the water miscibility like an ethanol may be mixed.

[0017]

Fat emulsion of this invention can be made to contain further additive agents, such as an isotonicizing-agent emulsification support agent, a stabilizer, and pH manufacture agent, depending on the need as carried out usually. As the isotonicizing agent which can be compounded, For example, glycerol; Sugar alcohols, such as sorbitol and a xylitol;

ビトール、キシリトールなどの糖アルコール；ブドウ糖、果糖などの単糖類；マルトースのような二糖類；L-アラニン、L-バリン、グリシンなどのアミノ酸等が挙げられ、これらのなかから適宜1種またはそれ以上を選んで使用される。これらの等張化剤は、脂肪乳剤が体液の浸透圧とほぼ同等になるように調製するために添加されるものであり、その量は脂肪乳剤中の最終濃度が一般に0.1～0.25モル/l、好ましくは0.25～0.35モル/lの範囲になるようなものである。

【0018】

また、適宜配合し得る乳化補助剤としては、例えば、炭素原子数10～20個の脂肪酸（例えば、ステアリン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸など）およびその塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩など）、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ステアリルアミン等が挙げられ、これらは一般に、0.04% (W/V) までの範囲、好ましくは0.01～0.2% (W/V) の範囲で使用することができ、特に上記脂肪酸またはその塩は、0.01～0.1% (W/V) の範囲で、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ステアリルアミンは0.05～0.3% (W/V)、特に0.1～0.2% (W/V) の範囲で有利に使用することができる。

Monosaccharide, such as glucose and fructose; Disaccharide like the maltose; Amino acids, such as L- alanine, L- valine, and a glycine, etc. are mentioned. Out of these, 1 sort or more is chosen suitably and it uses.

These isotonizing agents are added in order to prepare so that fat emulsion may become almost equivalent to the osmotic pressure of the humor.

As for the quantity, the last concentration in fat emulsion becomes the range of 0.1-0.5 mol/l generally, preferably 0.25-0.35 mol/l.

[0018]

As the emulsification adjuvant which can be compounded suitably, For example, the fatty acids (for example, a stearic acid, a palmitic acid, a linoleic acid, rilun acid, etc.) of 10-20 carbon atomic numbers and its salts (for example, a sodium salt, potassium salt, etc.), the phosphatidylethanolamine, the phosphatidylserine, a stearyl amine, etc. are mentioned. These can be generally used in the range to 0.04% (W/V) preferably 0.01-0.2% (W/V) of range. Especially an above fatty acid or its salt can be used in 0.01-0.1% (W/V) of the range. The phosphatidylethanolamine, the phosphatidylserine, and a stearyl amine can be advantageously used in 0.05-0.3% (W/V) of the range especially 0.1-0.2% (W/V).

【0019】

さらに、安定化剤としてはコレステロールまたはトコフェロールを用いることができる。コレステロールは一般には1.2% (W/V) まで、好ましくは0.2~0.4% (W/V) の範囲で使用するのが好ましい。

【0020】

また、安定化剤としては、アルブミンまたはその脂肪酸アミド誘導体、多糖類またはその脂肪酸エステル誘導体等も使用することができる。アルブミンとしては、ヒト用の製剤を調製することより、抗原性の観点よりヒト由来のものが好ましく、その脂肪酸アミド誘導体としては、アルブミン中に存在する全アミノ基の5~40%を、炭素原子数14~18個の脂肪酸（例えば、パルミチン酸、ステアリン酸など）でアミド化したものが挙げられる。他方、多糖類としては、デキストラン、プルラン、ヒドロキシエチルデンプン等が包含され、これら脂肪酸エステル誘導体としては、当該多糖類に存在する全水酸基の5~40%を、炭素原子数14~18個の脂肪酸（例えば、パルミチン酸、ステアリン酸など）によりエステル化したものが挙げられる。これらの安定化剤は一般には0.02~5% (W/V)、好ましくは0.2~2.5% (W/V) の範囲で添加することができる。

【0021】

本発明の脂肪乳剤は、通常の脂

[0019]

Furthermore, cholesterol or a tocopherol can be used as a stabilizer.

Generally, cholesterol is to 1.2% (W/V).

It is preferable to use in 0.2-0.4% (W/V) of the range preferably.

[0020]

Moreover, as a stabilizer, the albumin or its fatty-acid amide derivative, a polysaccharide, or its fatty-acid-ester derivative can be used.

The thing derived a human is more desirable from the viewpoint of an antigenicity than preparing the formulation for humans as albumin. That which amidated 5-40% of all the amino groups that exist in the albumin, by the fatty acids (for example, a palmitic acid, stearic acid, etc.) of 14-18 carbon atomic numbers as the fatty-acid amide derivative is mentioned.

A dextran, a pullulan, a hydroxyethyl starch, etc. are included as another side and a polysaccharide. That which esterified 5-40% of all the hydroxyl groups that exist in a polysaccharide, by the fatty acids (for example, a palmitic acid, stearic acid, etc.) of 14-18 carbon atomic numbers as these fatty-acid-ester derivative is mentioned.

Generally, these stabilizers can be added in 0.02-5% (W/V) of the range preferably 0.2-2.5% (W/V).

⑥

[0021]

Fat emulsion of this invention is usual fat

肪乳剤であり、そのなかでもカチオン性の脂肪乳剤が好ましい。カチオン性の脂肪乳剤とするには、乳剤処方においてコレステロール誘導体を加えるのが良く、かかるコレステロール誘導体としては、本発明の脂肪乳剤をカチオン性にするものであれば、一般的に使用されているコレステロール誘導体でよく、 3β {N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル}コレステロール、2-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)エチルアミン等があげられる。その添加量は、0.001~10% (W/V)、好ましくは0.01~5% (W/V)、より好ましくは0.1~2% (W/V)である。

【0022】

本発明の脂肪乳剤にあつては、脂肪乳剤中に占めるリピッドマイクロスフェアの濃度として、0.01~5%、好ましくは0.01~3%、さらに好ましくは0.01~1%の濃度で存在するのが、リピッドマイクロスフェアに対する導入遺伝子DNAの結合効率が良いことが判明した。したがって、上記してきた脂肪乳剤を構成する配合処方成分の配合量を適宜調製し、目的の濃度のリピッドマイクロスフェアを含有する脂肪乳剤とするのが良い。

【0023】

また、脂肪乳剤中における遺伝子DNAのリピッドマイクロスフェアに対する配合量は、

emulsion.

Fat emulsion of a cationic is among them preferable.

In order to consider as fat emulsion of a cationic, it is good to add a cholesterol derivative in emulsion prescription. As such a cholesterol derivative, if fat emulsion of this invention is made into a cationic, it is good at the cholesterol derivative currently used in general. 3β {N-(N',N'-dimethyl aminoethane) carbamoyl} cholesterol, 2-(cholesteryl oxycarbonyl amino) ethylamine, etc. are mentioned.

The additional amount is 0.001-10% (W/V). Preferably, it is 0.01-5% (W/V).

It is 0.1-2% (W/V) more preferable.

【0022】

In fat emulsion of this invention, as concentration of the lipid microsphere occupied in fat emulsion, it is 0.01-5%. Preferably, it is 0.01-3%.

More preferably, it is 0.01-1%. It became clear that existing by the concentration of an above is good as for the coupling efficiency of transducing-gene DNA with respect to a lipid microsphere.

Therefore, the compounding quantity of the blending prescription component which constitutes fat emulsion which has carried out the above is prepared suitably.

It is good to consider as fat emulsion containing the lipid microsphere of target concentration.

【0023】

Moreover, various alteration of the compounding quantity with respect to the lipid microsphere of gene DNA in fat emulsion can

種々変更することができるが、一般的には、リピッドマイクロスフェア25～50 μ gに対し、1～20 μ gの遺伝子DNAを使用するのが良い。

【0024】

本発明の脂肪乳剤は、それ自体公知の乳化方法により製造することができる。その際、乳化機としては通常ホモジナイザーを使用することができるが、安定で微細な脂肪乳剤を調製するためには、2種類のホモジナイザーを併用するのが良い。具体的な製法としては、通常脂肪乳剤の調製においては、例えば、所定量の大豆油に、所定量の乳化剤、例えば精製卵黄リン脂質（精製卵黄レシチン）を加え、90℃にて5分間程度、15,000rpm条件下でホモジナイズする。次いで水および必要に応じて他の添加剤、例えば等張化剤としてのグリセリンを加え、90℃にて20分程度、20,000rpm条件下でホモジナイズする。かくして得られた乳化物を更にFrench Pressure Cell Pressで5回程度処理することにより脂肪乳剤を作製する。ついで、目的とする導入遺伝子DNA（オリゴヌクレオチド、または種々のベクターに組み込んだ構造遺伝子）を混合することにより、リピッドマイクロスフェアの表面に導入遺伝子DNAが結合した本発明の脂肪乳剤が調製される。

【0025】

be carried out.

However, generally, it is good to use gene DNA of 1 - 20 μ g to the lipid microsphere 25 - 50 μ g.

[0024]

Fat emulsion of this invention can be manufactured by the well-known emulsification method itself.

As an emulsification equipment, a usual homogenizer can be used in that case.

However, in order to prepare stable and fine fat emulsion, it is good to use 2 kinds of homogenizers together.

As a concrete process, in manufacture of usual fat emulsion, For example, it adds to the soy bean oil of a predetermined amount, the emulsifier (refinement yolk lecithin), for example, refinement yolk phospholipid, of a predetermined amount. It homogenizes on condition that about 5 minutes and 15,000 rpm at 90 degree C.

Subsequently water and the other additive agent, depending on the need, for example, glycerol as an isotonicizing agent, is added. It homogenizes on condition that 20,000 rpm about 20 minutes at 90 degree C.

Fat emulsion is produced by processing further the emulsion obtained in this way about 5 times by French Pressure Cell Press.

Subsequently, fat emulsion of this invention which transducing-gene DNA connected on the surface of a lipid microsphere is prepared by mixing target transducing-gene DNA (oligonucleotide or structural gene integrated in the various vector).

[0025]

また、カチオン性の脂肪乳剤の調製においては、例えば、所定量の大豆油に、コレステロール誘導体、例えば 3β {N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル} コレステロールあるいは2-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)エチルアミン、および所定量の乳化剤、例えば精製卵黄リン脂質(精製卵黄レシチン)を加え、 90°C にて5分間程度、15,000 rpm条件下でホモジナイズする。次いで水および必要に応じて他の添加剤、例えば等張化剤としてのグリセリンを加え、 90°C にて20分程度、20,000 rpm条件下でホモジナイズすることにより乳化物を、French Pressure Cell Pressを5回程度処理することにより、脂肪乳剤を作製する。目的とする導入遺伝子DNA(オリゴヌクレオチドまたは種々のベクターに組み込んだ構造遺伝子)を混合することにより、リピッドマイクロスフェアの表面に導入遺伝子DNAが結合した本発明の脂肪乳剤が調製される。

【0026】

以下に本発明を、実施例に代わる試験例で詳細に説明する。なお、本発明は以下に記載の試験例に限定されるものでないことはいうまでもない。導入遺伝子としてインターロイキン- 1β 遺伝子の開始コドンを含む20量体のホスホロチオエート型アンチセンスDNAを用い、脂肪

Moreover, in manufacturing of fat emulsion of a cationic, For example, a cholesterol derivative, for example, 3β {N-(N',N'-dimethyl aminoethane) carbamoyl} cholesterol, or 2-(cholesteryl oxycarbonyl amino) ethylamine and the emulsifier of a predetermined amount, for example, refinement yolk phospholipid, (refinement yolk lecithin) are added to the soy bean oil of a predetermined amount. It homogenizes on condition that about 5 minutes and 15,000 rpm at 90°C .

Subsequently water and the other additive agent depending on the need, for example, glycerol as an isotonicizing agent, is added. The emulsion was obtained by homogenizing on condition that 20,000 rpm about 20 minutes at 90°C .

Subsequently fat emulsion is produced by processing this emulsion French Pressure Cell Press about 5 times.

By mixing target transducing-gene DNA (structural gene integrated in the oligonucleotide or the various vector), fat emulsion of this invention which transducing-gene DNA connected on the surface of a lipid microsphere is prepared.

[0026]

The EXPERIMENT which replaces this invention with an Example demonstrates in detail below.

In addition, it does not need to say that this invention is not what is limited to an EXPERIMENT described in the following.

Phosphorothioate type anti sense DNA of the 20 quantity object which contains the initiating codon of interleukin- 1β gene as a transducing gene is used. Concrete fat emulsion which



乳剤中のリピッドマイクロスフェアの表面に、アンチセンスDNAを結合させた具体的脂肪乳剤について検討した。

【0027】

アンチセンスとは、標的となる塩基配列と相補的な配列を意味する。すなわち、二重鎖DNA構造遺伝子で、情報を読み取られる側のDNAをセンス、もう一方の相補的なDNAをアンチセンスという。したがって、タンパク質の遺伝情報を担うmRNAのセンス鎖のなかで、標的となる部分塩基配列に対して相補的なアンチセンス鎖を細胞内に導入して、その遺伝情報の発現を抑制して病因となるタンパク質産生を疎外して疾患を治療することができる（アンチセンス法）。インターロイキン-1 β （IL-1 β ）は、炎症などの病態に中心的に関与するサイトカインであり、このIL-1 β の産生を抑制すれば、慢性関節リウマチなどIL-1がかかわる病態を著しく改善できるものと期待される。

【0028】

試験例1：リピッドマイクロスフェアは次のようにして作製した。大豆油1g、3 β {N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル} コolestérol 2.4mgおよび卵黄レシチン117.6mgを90°Cにて5分間、15,000rpm回転でホモジナイズした。次いで、このものに注射用蒸留水9mlおよびグリセリン

made the surface of the lipid microsphere in fat emulsion connect anti sense DNA was examined.

[0027]

An anti sense implies a complementary sequence as the base sequence which serves as a target.

That is, DNA of the side read in information is called sense in the double chain DNA structural gene. Another complementary DNA is called anti sense.

Therefore, a complementary anti sense chain is intracellularly transduced to the partial base sequence which serves as a target in the sense chain of mRNA which bears a proteinic genetic information.

A protein production which suppresses an expression of the genetic information and serves as the pathogenesis can be alienated, and the illness can be treated (anti sense method).

An interleukin-1 β (IL-1 β) is cytokine which participates in illness conditions, such as inflammation, mainly.

If a production of this IL-1 β is suppressed, it is anticipated that the illness condition with which IL-1s, such as the rheumatoid arthritis, are concerned is remarkably improvable.

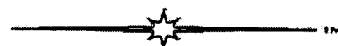
[0028]

EXPERIMENT 1: The lipid microsphere was produced as follows.

Soy-bean-oils 1g and 3 β {N-(N',N'-dimethyl aminoethane) carbamoyl} cholesterol 2.4 mg and yolk lecithin 117.6 mg were homogenized by 5 minutes and 15,000 rpm rotation at 90 degree C.

Subsequently, 9 ml of water for injection and glycerol 0.25g was added to this, and it homogenized by 20 minutes and 20,000 rpm at 90 degree C.

The lipid microsphere of 0.2 micrometers of particle diameters was produced by processing



0.25 gを加え、90℃にて20分間、20,000 rpmでホモジナイズした。得られた乳化物を、French Pressure Cell Pressを5回程度処理することにより、粒子径0.2 μ mのリピッドマイクロスフェアを作製した。ついで、上記方法で得たリピッドマイクロスフェアを用い、その0.01%、0.1%ならびに1%溶液（各、LM0.01%、LM0.1%、LM1%と表示する。）に、5'端を³²Pで標識したIL-1 β のホスホロチオエート型アンチセンスDNAを混合し、リピッドマイクロスフェア表面に³²P標識アンチセンスDNAが結合した脂肪乳剤を作製した。このものを、ヒト単球系の細胞株、U937細胞に作用させ、その細胞内への遺伝子DNA（IL-1 β アンチセンスDNA）の取り込みを観察した。その結果、図1に示すごとく、LM0.01%、LM0.1%、LM1%溶液は、コントロールに比較し、有意にIL-1 β アンチセンスDNAであるオリゴヌクレオチドが取り込まれており、本発明の脂肪乳剤は、遺伝子の細胞内導入用キャリアすなわち、脂肪乳剤中のリピッドマイクロスフェアが、導入遺伝子DNAに対しキャリアとしての役目を果たしていることが理解される。

【0029】

試験例2：試験例1で得たリピッドマイクロスフェアを用い、その0.01%（LM0.

the obtained emulsion French Pressure Cell Press about 5 times.

The lipid microsphere obtained by the above method is used. Phosphorothioate type anti sense DNA of IL-1 β which labeled 5'end by ³²P in the solution the 0.01%, 0.1%, and 1% (it displays as, LM0.01%, LM0.1%, and LM1%) is mixed.

Fat emulsion which ³²P label anti sense DNA connected on the lipid microsphere surface was produced.

This is made act on the cell strain of a human monocyte type, U937 cell.

Fetching of gene DNA (IL-1 β anti sense DNA) to the intracellular was observed.

As shown in Figure 1 as a result, LM0.01%, LM0.1%, and LM1% solution compared with control, the oligonucleotide which is IL-1 β anti sense DNA significantly is received.

It is understood that, as for fat emulsion of this invention, the carrier for intracellular transduction, i.e., lipid microsphere in fat emulsion, of a gene have achieved the role as a carrier to transducing-gene DNA.

[0029]

EXPERIMENT 2 : The lipid microsphere obtained by EXPERIMENT 1 is used. 0.01% (it displays as LM0.01%) of the fat emulsion is

0.1%と表示する。)の脂肪乳剤を使用し、IL-1 β アンチセンスDNAのオリゴヌクレオチドの添加混合量を変化(2、5、10、20 μ M)させ、IL-1 β 細胞株に作用させたのち、その細胞が実際にどの程度IL-1 β の産生を抑制しているかを観察した。IL-1 β 産生細胞としては、前述のヒト単球系細胞株、U937細胞を使用した。U937細胞は、10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640培地中で 2×10^4 /mlとし、12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetateを1ng/mlおよびlipopolysaccharideを1 μ g/ml加え、さらにIL-1 β アンチセンスDNAの脂肪乳剤を加え、37 $^{\circ}$ Cにて24時間培養し、IL-1 β の産生を測定した。その結果を図2に示した。図中の結果からも明らかな如く、本発明の脂肪乳剤(LM0.01%溶液)を作用させた細胞は、遺伝子DNAの導入が行なわれた結果、コントロールと比較し、有意にIL-1 β の産生を抑制していることが判明した。

【0030】

以上の実験は、遺伝子DNAをオリゴヌクレオチドとしてリピッドマイクロスフェアの表面に結合させ、標的細胞と作用させ、細胞内に遺伝子DNAを導入させたものであるが、導入遺伝子DNAとしては、種々のベクターに組み込んだ構造遺伝子であ

used. The amount of adding-mixings of the oligonucleotide of IL-1 β anti sense DNA is changed (2, 5, 10, 20 μ M).

After making act on IL-1 β cell strain, it observed how much the cell would actually have suppressed the production of IL-1 β .

As an IL-1 β production cell, the above-mentioned human monocyte type cell strain, U937 cell were used.

U937 cell is set to 2×10^4 /ml in RPMI-1640 times the underground which contains a fetal calf serum 10%.

12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate 1ng/ml and lipopolysaccharide 1 μ g/ml are added. Furthermore fat emulsion of IL-1 β anti sense DNA was added, it cultivated for 24 hours at 37 degree C, and the production of IL-1 β was measured.

The result was shown in Figure 2.

Clear from the result in a figure, As for the cell which made fat emulsion (LM0.01% solution) of this invention act, transduction of gene DNA was performed.

As a result, compared with control it became clear to have suppressed the production of IL-1 β significantly.

[0030]

The above experiment makes gene DNA the oligonucleotide and the surface of a lipid microsphere is made to connect it.

It makes act with the target cell.

Gene DNA is made to transduce intracellularly.

However, the structural gene integrated in the various vector as transducing-gene DNA is sufficient.

ってもよい。そこで、構造遺伝子が組み込まれたベクターの一つとして pMAMneo を用い、本発明の脂肪乳剤を作製し、その導入効果を調べた。

【0031】

試験例 3 : 実験には、構造遺伝子が組み込まれたベクターとしての pMAMneo は、ニックトランスレーション法による ³²P ラベル化したものを使用した。ベクター濃度としてそれぞれ 1、5、10、20 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ 蒸留水溶液を用いた。この溶液 50 μl を、蒸留水 50 μl 、あるいは 25、または 50 μg リピッドマイクロスフェア / 50 μl 蒸留水と混合し、この各 100 μl 混合溶液を室温にて 30 分間緩やかに混合したのち、細胞 (CHO-K 1) に滴下しながら加え、できるだけ均質にした。5% 二酸化炭素雰囲気湿度下、37°C にて 4 時間細胞を培養した。ついで、10% 胎児血清含有の HAM 培地に加え、上記条件下にて 48 時間培養した。培養後、細胞を 5 ml の PBS で 2 回洗浄し、細胞の DNA をエタノールで抽出し、DNA の放射活性を測定した。なお、リピッドマイクロスフェア濃度としては、0.01% (LM0.01%)、0.005% (LM0.005%) に該当するものである。また、対照として、*in vivo* 法で汎用されているリポフェクチン (Lipofectin) の 0.01% 溶液を同様実験した。その結果を、図 3 に示す。図中

Then, pMAMneo is used as one of the vectors in which the structural gene was integrated. Fat emulsion of this invention was produced and the transduction effect was investigated.

[0031]

EXPERIMENT 3: pMAMneo as a vector in which the structural gene was integrated used the thing which is based on a nick-translation method and which was labelled ³²P to experiment.

As vector concentration, 1,5,10,20 $\mu\text{g}/50$ microlitre distillation aqueous solution was used.

50 μl of this solution is mixed with 50 μl of distilled water, 25, or 50 μg lipid microsphere / 50 μl distilled water.

After mixing each of these 100 μl mixed solution gently 30 minutes at a room temperature, Adding, being dropped at cell (CHO-K 1) It was made as homogeneous as possible.

The cell was cultivated for 4 hours at 37 degree C under 5% carbon-dioxide-atmosphere humidity.

Subsequently, it adds to a fetus blood-serum containing HAM culture medium 10%. It cultivated for 48 hours on above conditions.

After cultivating, a cell is washed twice by 5 ml PBS.

DNA of a cell was extracted by the ethanol and the radiation activity of DNA was measured.

In addition, as lipid microsphere concentration, it corresponds to 0.01% (LM0.01%) and 0.005% (LM0.005%).

Moreover, it experimented in 0.01% solution of the Lipofectin (Lipofectin) currently used widely by *in vivo* method similarly contrast.

The result is shown in Figure 3.

Clearly from the result in a figure, fat emulsion (LM0.01%) of 0.01% of this invention as lipid microsphere concentration, when making it add there by vector concentration 1,5,10,20 $\mu\text{g}/50$ microlitre of pMAMneo, it can understand that a transducing-gene vector is

の結果から明らかな如く、リピッドマイクロスフェア濃度として0.01%の本発明の脂肪乳剤(LM0.01%)で、そこにpMAMneoのベクター濃度が1、5、10、20 μ g/50 μ lで添加させた場合も、いずれも導入遺伝子ベクターが細胞内に効率よく導入されていることが理解できる。

transduced efficiently intracellularly.

【0032】

試験例4：脂肪乳剤成分の変化による、導入遺伝子DNAの導入効果：以下に記載の成分ならびに配合量により、2種のリピッドマイクロスフェアを作製した。

リピッドマイクロスフェア
No. 1 (5ml中)

大豆油(脂肪乳剤基剤)
ホスファチジルコリン

60mg

ジオレイルホスファチ
ジル

エタノールアミ
ン

10mg

3 β {N-(N',N'-ジメチル

アミノエタン) カル
バモイル} コレステロール
10mg

リピッドマイクロスフェア
No. 2 (5ml中)

大豆油(脂肪乳剤基剤)
ホスファチジルコリン

60mg

ジオレイルホスファチ
ジル

エタノールアミ
ン

[0032]

EXPERIMENT 4: Transduction effect of transducing-gene DNA by variation of fat emulsion component: By the component and the compounding quantity of a publication, 2 sorts of lipid microspheres were produced below.

Lipid microsphere No.1 (inside of 5 ml)

Soy bean oil (fat emulsion base)	
Phosphatidylcholine	60 mg

Diolel phosphatidylethanolamine	10 mg
3 β {N-(N',N'-dimethyl aminoethane) carbamoyl}	
cholesterol	10 mg

Lipid microsphere No.2 (inside of 5 ml)

Soy-bean-oil (fat emulsion base)	
phosphatidylcholine	60 mg

Diolel phosphatidylethanolamine	10 mg
2-(cholesteryl oxycarbonyl amino) ethylamine	10 mg

10 mg

2- (コレステリルオ
キシカルボニルアミノ) エチル
ア ミ ン

10 mg

【0033】

上記で得たリピッドマイクロ
スフェアを1%溶液とした脂肪
乳剤とし、そこに前記試験例3
で使用した遺伝子ベクター (³²
Pラベル化pMAMneo) と
混合し、試験対象の脂肪乳剤を
得た。この脂肪乳剤を試験例3
に記載した方法と同様に処理
し、細胞内に導入された遺伝子
ベクターの放射活性を測定し
た。実験は、リピッドマイクロ
スフェア各群で遺伝子ベクタ
ーの混合量を変化させものとし
て、3回行なった。なお、コン
トロールとしては、脂肪乳剤に
混合しないpMAMneoの放
射活性をおいた。その結果を表
1に示す。

【0034】

【表1】

[0033]

The lipid microsphere obtained by the above is
used as fat emulsion used as the solution 1%,
and it mixes with the gene vector (32P labeled
pMAMneo) used there by above-mentioned
EXPERIMENT 3.

Fat emulsion for an examination was
obtained.

It processes like the method to have described
this fat emulsion to EXPERIMENT 3.

The radiation activity of the gene vector
transduced intracellularly was measured.

Experiment, As that which changed the
amount of mixing of a gene vector by each lipid
microsphere group, it carried out 3 times.

In addition, as control, the radiation activity of
pMAMneo not mixed to fat emulsion was set.

The result is shown in Table 1.

[0034]

[Table 1]

表 1 : 細胞に取り込まれたベクターの放射活性値

試験脂肪乳剤	放射活性値
リピッドマイクロスフェア No. 1	2121.0
〃	2393.0
〃	1677.0
リピッドマイクロスフェア No. 2	3110.0
〃	3154.0
〃	2653.0
コントロール	1627.0
〃	1806.0
〃	1714.0

Table 1: Radiation active value of the vector received to the cell

First row (left to right): Test fat emulsion, Radiation active value

First column (top to bottom): Lipid microsphere No.1, Lipid microsphere No.2, Control

【0035】

表中の結果より明らかな如く、コントロール群に比較し、本発明の脂肪乳剤は、有意に遺伝子ベクターDNAを細胞内に取り込んでいることが判明する。

[0035]

Clearly from the result in a table, compared with a control group, fat emulsion of this invention, it becomes clear to have received gene vector DNA intracellularly significantly.

【発明の効果】

[EFFECT OF THE INVENTION]

【0036】

以上記載のように、本発明の脂肪乳剤は、導入遺伝子DNAを、脂肪乳剤中のリピッドマイクロスフェアに結合してやることにより、該リピッドマイクロスフェアがキャリアとなって、選択的に癌（腫瘍）細胞等に移送され、その場でリピッドマイ

[0036]

As it was described above, Fat emulsion of this invention, Transducing-gene DNA is connected to the lipid microsphere in fat emulsion. Thereby, this lipid microsphere serves as a carrier. It transfers to a cancer (tumor) cell etc. selectively, gene DNA connected by the lipid microsphere on that occasion enters in a nucleus, and transduction of a gene is performed.

クロスフェアーに結合された遺伝子DNAが核内に入って、遺伝子の導入が行なわれており、有効な遺伝子治療法の確立が得るものである。したがって、本発明は、難治性疾患患者に多大の光明を与えるものであり、その利用価値は優れたものであるといえる。

Establishment of an effective gene-therapy method may be able to be performed.

Therefore, this invention gives an intractable illness patient a great light.

It can be said that the utilization value is excellent.

【図面の簡単な説明】

[BRIEF EXPLANATION OF DRAWINGS]

【図 1】

本発明の試験例 1 における細胞内への遺伝子DNA (IL-1 β アンチセンスDNA) の取り込み効果の結果を示す図である。

[FIGURE 1]

It is the figure showing the result of the fetching effect of gene DNA (IL-1 β anti sense DNA) to the intracellular in EXPERIMENT 1 of this invention.

【図 2】

本発明の試験例 2 における IL-1 β の産生抑制効果の結果を示す図である。

[FIGURE 2]

It is the figure showing the result of the production inhibitory effect of IL-1 β in EXPERIMENT 2 of this invention.

【図 3】

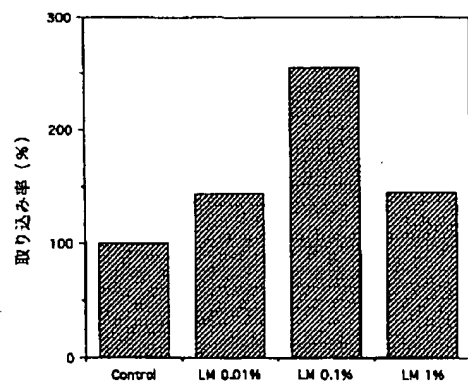
本発明の試験例 3 における pMAMneo の遺伝子ベクターの細胞内取り込み効果の結果を示す図である。

[FIGURE 3]

It is the figure showing the result of the intracellular fetching effect of the gene vector of pMAMneo in EXPERIMENT 3 of this invention.

【図 1】

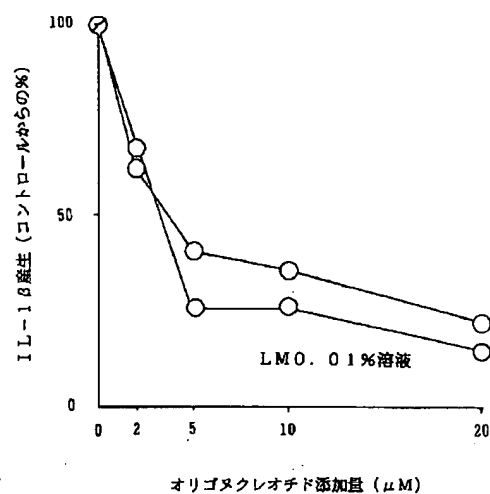
[FIGURE 1]



Vertical axis: Uptake percentage (%)

【図 2】

[FIGURE 2]



Vertical axis: IL-1(beta) production (% from control)

Horizontal axis: Oligonucleotide additional amount (μM)

(In the graph) LM0.01% solution

【図 3】

[FIGURE 3]

JP7-330614-A

THOMSON
DERWENT

